

516,517

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

02 DEC 2004

(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/033687 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/12,  
C07K 14/705, C12N 5/10, C12P 21/02, G01N 33/50,  
33/15, A61K 38/16, A61P 13/12 // (C12N 15/12, C12R  
1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91) (C12P 21/02, C12R 1:91)城県 つくば市 御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内  
Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012967

(74) 代理人: 長井 省三, 外(NAGAI,Shozo et al.); 〒174-  
8612 東京都板橋区蓮根三丁目 1 7 番 1 号 山之内製  
薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-298958  
2002 年 10 月 11 日 (11.10.2002) JP(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内  
製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL  
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋  
本町二丁目 3 番 1 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 遠城 健太郎  
(ENJO,Kentaro) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県 つくば市  
御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 黒  
光 貞夫 (KUROMITSU,Sadao) [JP/JP]; 〒305-8585 茨

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING REMEDY FOR RENAL FAILURE

(54) 発明の名称: 腎不全治療薬をスクリーニングする方法

(57) Abstract: A screening tool for obtaining a remedy for renal failure, a convenient screening method, a medicinal composition for treating renal failure and a process for producing the same. The screening tool as described above comprises a G protein-coupled receptor FGK which is a polypeptide capable of activating CTGF promoter, a functionally equivalent modification thereof, a polypeptide homologous with it or cells expressing the above polypeptide. In the above screening method, the inhibition of the above-described polypeptide is employed as an indication.

(57) 要約: 腎不全治療薬を得るためのスクリーニングツール及び簡便なスクリーニング方法、並びに腎不全治療用医薬組成物及びその製造方法を開示する。前記スクリーニングツールはCTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチドであるG蛋白質共役型受容体FGK、その機能的等価改変体、又は相同ポリペプチドであるか、あるいは前記ポリペプチドを発現している細胞である。スクリーニング方法は、前記ポリペプチドの阻害を指標とする方法である。

WO 2004/033687 A1

## 明 細 書

## 腎不全治療薬をスクリーニングする方法

## 技術分野

本発明は、オーファンGPCRを発現している細胞及び該細胞を使用する腎不全治療薬のスクリーニング法に関する。

## 背景技術

腎疾患による慢性透析患者は年々増加している。これは医療経済的にも大きな問題であり、その進行の改善が強く望まれている。腎障害の原因は慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、高血圧性腎硬化症など多岐に渡り、成因も免疫学的機序、高血圧等様々である。しかし原因に拠らず、ある段階から糸球体障害には共通の進展機序が考えられている。それは Brenner らによって提唱された過剰濾過 (hyperfiltration) 説に基づく考え方である (非特許文献 1)。以下に過剰濾過説を概説すると、まず糸球体障害による機能ネフロン減少、高血圧、高血糖、蛋白過剰摂取等により腎臓内の血行動態が変化して糸球体内圧の上昇が起こり、いわゆる糸球体内高血圧と呼ばれる状態になる。そしてこれが糸球体細胞障害を惹起する。その結果メサングウム細胞の形質変換、細胞外基質の産生亢進を促し、更には糸球体硬化へと進展する。これにより機能ネフロンが減少すると残存する機能ネフロンの糸球体内圧は更に上昇する。当初は糸球体が代償的に肥大し、機能喪失したネフロンを補うが、最終的には物理的破綻をきたす。この悪循環によって糸球体硬化が加速度的に進行し、末期腎不全に陥る。この糸球体硬化及び尿細管間質における細胞外基質の産生亢進は総じて腎線維化 (renal fibrosis) と呼ばれており、原疾患を問わず腎不全進行と一致する組織学的変化である (非特許文献 2)。よって個々の原疾患に対する治療の重要性は言うまでもないが、共通の進行機序である線維化の抑制は有力な治療アプローチであると考えられる。

線維化には様々なサイトカインや成長因子の関与が知られているが、中でも TGF- $\beta$  はファイブロネクチンや I 型コラーゲンなどの細胞外基質構成蛋白質の産

生を誘導すること（非特許文献 3）、細胞外基質分解酵素の発現／機能を抑制すること（非特許文献 4）等から最も重要な進展因子と考えられている。更に TGF- $\beta$  中和抗体（非特許文献 5）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（非特許文献 6）、デコリン（非特許文献 7）、TGF- $\beta$  レセプター中和抗体（非特許文献 8）を用いた TGF- $\beta$  の発現／機能抑制が腎臓の細胞外基質の増加を抑制することが腎炎モデル動物で示されており、その有効性がすでに明らかになっている。この様に TGF- $\beta$  シグナル阻害は腎線維化抑制を機序とする腎不全治療につながることを示されている。しかし TGF- $\beta$  は線維化促進作用の他にも抗炎症作用や腫瘍増殖抑制作用を持つ重要なサイトカインであり、TGF- $\beta$  ノックアウトマウスは自己免疫疾患で死亡する（非特許文献 9）ことなどから、線維化抑制のためには TGF- $\beta$  を直接阻害するのではなく、TGF- $\beta$  の下流でその線維化促進作用を仲介する因子を阻害することがより望ましいと考えられた（非特許文献 10）。

近年 TGF- $\beta$  により発現が誘導される新しいサイトカインの結合組織成長因子（CTGF）が発見され（非特許文献 11）、CTGF 発現により細胞外基質の産生が誘導されること（非特許文献 12）、CTGF アンチセンスオリゴヌクレオチドや抗 CTGF 抗体により TGF- $\beta$  誘導のコラーゲン発現が抑制されること（非特許文献 13）、ヒト腎線維化病理組織像において CTGF の発現が上昇していること（非特許文献 14）、ラット病態モデル腎臓において CTGF 発現が TGF- $\beta$  と共に上昇すること（非特許文献 15）、更に肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor）が CTGF 産生抑制を介してマウス病態モデル腎臓の線維化を抑制すること（非特許文献 16）などが報告されている。これらを総合すると、腎組織において TGF- $\beta$  が CTGF の発現を誘導し、更に CTGF が TGF- $\beta$  と共に細胞外基質の産生を亢進させて線維化を促進させる機序が明らかになった（非特許文献 17）。すなわち CTGF が腎線維化において TGF- $\beta$  の下流に位置するサイトカインであることが明らかになり、新たな治療標的となることが示された（非特許文献 18）。また TGF- $\beta$  や CTGF によって発現が誘導される I 型コラーゲンはヒト正常腎では発現が低く、病態腎の糸球体や尿細管上皮において発現が上昇していること（非特許文献 19）、培養マウスメサングウム細胞での高糖負荷による内在性 TGF- $\beta$  発現誘導により I 型コラーゲンの発現が上昇すること（非特許文献 20）など、病態

との関与が指摘されている。一方、CTGFは脳、胎盤、肺、肝臓、腎臓、骨格筋など幅広い組織で発現しており、発現に組織特異性は見られない（非特許文献22）。

FGK (Fibrogenic GPCR in kidney) は2001年に報告されたGPR91と同一のオーファンGPCRである（非特許文献21）。ヒトGPR91、マウスGPR91はそれぞれアミノ酸330個、317個から成るポリペプチドであり、膜貫通領域を7箇所持つ7回膜貫通型レセプターと考えられている。ヒト、マウスGPR91は互いに約68%の相同性を有している。ヒトGPR91は腎臓にのみ発現が認められ、マウスGPR91は腎臓のほかに肝臓にも若干の発現が見られる。アフリカツメガエル卵黄を用いた反応系において、UTPがヒトGPR91のリガンドとして機能することが報告されている（特許文献1）が、GPR91に共役するGタンパク質や生理機能は不明である。特許文献2～9にはFGKと相同性を有する配列が開示されているが、アデノシン受容体であること（特許文献9）、P2U2プリン受容体であること（特許文献8）の他には発現に関する情報が記載されているにすぎず、その生理機能は不明であった。

（特許文献1）

国際公開第97/20045号パンフレット

（特許文献2）

国際公開第97/24929号パンフレット

（特許文献3）

国際公開第01/98351号パンフレット

（特許文献4）

国際公開第00/22131号パンフレット

（特許文献5）

国際公開第01/90304号パンフレット

（特許文献6）

国際公開第00/31258号パンフレット

（特許文献7）

国際公開第02/00719号パンフレット

(特許文献 8)

国際公開第 02/61087 号パンフレット

(特許文献 9)

US02/137887 号

(非特許文献 1)

「ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(The New England Journal of Medicine)」、(米国)、1982 年、第 307 巻、p. 652-659

(非特許文献 2)

「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソサイアティー・オブ・ネフロロジー(Journal of the American Society of Nephrology)」、(米国)、1996 年、第 7 巻、p. 2495-2508

(非特許文献 3)

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、1987 年、第 262 巻、p. 6443-6446

(非特許文献 4)

「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソサイアティー・オブ・ネフロロジー(Journal of the American Society of Nephrology)」、(米国)、1999 年、第 10 巻、p. 790-795

(非特許文献 5)

「ネイチャー(Nature)」、(英国)、1990 年、第 346 巻、p. 371-374

(非特許文献 6)

「キドニー・インターナショナル(Kidney international)」、(米国)、1996 年、第 50 巻、p. 148-155

(非特許文献 7)

「ネイチャー(Nature)」、(英国)、1992 年、第 360 巻、p. 361-364

(非特許文献 8)

「キドニー・インターナショナル(Kidney international)」、(米国)、2001 年、第 60 巻、p. 1745-1755

(非特許文献 9)

「ネイチャー(Nature)」、(英国)、1992 年、第 359 巻、p. 693-699

(非特許文献 10)

「キドニー・インターナショナル(Kidney international)」、(米国)、1997 年、第 51 巻、p. 1388-1396

(非特許文献 11)

「モレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・セル(Molecular Biology of the Cell)」、(米国)、1993 年、第 4 巻、p. 637-645

(非特許文献 12)

「ザ・ジャーナル・オブ・インベスティゲイティブ・ダーマトロジー(The Journal of Investigative Dermatology)」、(米国)、1996 年、第 107 巻、p. 404-411

(非特許文献 13)

「ジ・エフイーエスイービー・ジャーナル(The FASEB Journal)」、(米国)、1999 年、第 13 巻、p. 1774-1786

(非特許文献 14)

「キドニー・インターナショナル(Kidney international)」、(米国)、1998 年、第 53 巻、p. 853-861

(非特許文献 15)

「アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー・レナル・フィジオロジー(American Journal of Physiology-Renal Physiology)」、(米国)、2002 年、第 282 巻、p. F933-F942

(非特許文献 16)

「ジ・エフイーエスイービー・ジャーナル(The FASEB Journal)」、(米国)、2003 年、第 17 巻、p. 268-270

(非特許文献 17)

「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソサイアティー・オブ・ネフロロジー(Journal of the American Society of Nephrology)」、(米国)、2001 年、第 12 巻、p. 472-484

(非特許文献 18)

「キドニー・インターナショナル(Kidney international)」、(米国)、2000年、第 58 巻、p. 1389-1399

(非特許文献 19)

「キドニー・インターナショナル(Kidney international)」、(米国)、2002年、第 62 巻、p. 137-146

(非特許文献 20)

「ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲイション(The Journal of Clinical Investigation)」、(米国)、1994 年、第 93 巻、p. 536-542

(非特許文献 21)

「ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)」、(英国)、2001 年、第 307 巻、p. 799-813

(非特許文献 22)

「サーキュレーション (Circulation)」、(米国)、1997 年、第 95 巻、p. 831-839

## 発明の開示

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、オーファン GPCR である FGK は腎臓特異的に発現しており、腎不全における創薬標的である CTGF のプロモーターを活性化することを見出した。この知見をもとにして、FGK 阻害を指標に CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、すなわち FGK 阻害剤を選択することによる CTGF 発現抑制に基づく腎不全治療薬のスクリーニング方法を構築した。更に、FGK それ自身単独でもその活性の変化を指標にして腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることができることを見出し、確かに FGK のインバースアゴニストが CTGF 発現を抑制することを見出した。このことから FGK インバースアゴニストを選択することによる腎不全治療薬をスクリーニングする方法を確立した。上述したように CTGF は幅広い組織で発現しており、発現に組織特異性は見られないことから単に CTGF 遺伝子のプロモーター領域を用いてスクリーニングした

場合、その結果物は腎臓のみならず全組織で CTGF の産生を抑制することになり、CTGF の作用である細胞増殖や細胞外基質産生の阻害に基づく副作用が懸念される。一方、FGK が CTGF プロモーターを活性化するという本発明者らが見出した知見を元にして構築した FGK 阻害を指標に CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする系を用いた場合、FGK は腎臓特異的に発現することから、そのスクリーニング結果物による CTGF 産生抑制は腎臓特異的であり、その他の組織での発現抑制は起こらないことが期待される。

これらの結果、本発明者らは、簡便な腎不全治療薬のスクリーニング方法、並びに腎不全治療用医薬組成物及びその製造方法を提供し、本発明を完成させた。

すなわち本発明は、

〔１〕配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号２で表されるアミノ酸配列において１～１０個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGF プロモーターを活性化することができるポリペプチドである腎不全治療薬スクリーニングツール、

〔２〕〔１〕に記載のポリペプチドを発現している細胞である腎不全治療薬スクリーニングツール、

〔３〕Ｃ末端のアミノ酸配列が、配列番号１６で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼＣ活性促進性Ｇ蛋白質のホスホリパーゼＣ活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるＧ蛋白質キメラを共発現している〔２〕に記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び

前記細胞内における〔１〕に記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物がインバースアゴニストであるか否かを検出する方法、

〔４〕Ｃ末端のアミノ酸配列が、配列番号１６で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼＣ活性促進性Ｇ蛋白質のホスホリパーゼＣ活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるＧ蛋白質キメラを共発現している〔２〕に記載の細胞と、試験化



合物とを接触させる工程及び

前記細胞内における〔１〕記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、腎不全治療薬をスクリーニングする方法、

〔５〕下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号１３の DNA を発現している

〔２〕に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び

前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする CTGF の発現を抑制する物質をスクリーニングする方法

〔６〕CTGF の発現を抑制する物質が腎不全治療薬である〔５〕に記載のスクリーニングする方法、

〔７〕下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号１４の DNA を発現している請求項２に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び

前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする腎不全治療薬をスクリーニングする方法、

〔８〕〔１〕に記載のポリペプチドのインバースアゴニストを含有する腎不全治療用医薬組成物、

〔９〕〔４〕乃至〔７〕に記載の方法によって得られる物質を含有する腎不全治療用医薬組成物、

〔１０〕〔４〕乃至〔７〕に記載の方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、腎不全治療用医薬組成物の製造方法、

〔１１〕〔１〕に記載のポリペプチドのインバースアゴニスト及び／又は〔４〕乃至〔７〕に記載の方法によって得られる物質を腎不全治療が必要な対象に有効量で投与することを含む、腎不全治療方法、

〔１２〕〔１〕に記載のポリペプチドのインバースアゴニスト及び／又は〔４〕乃至〔７〕に記載の方法によって得られる物質の、腎不全治療用医薬組成物を製造するための使用

に関する。

特許文献１には本発明のスクリーニングツールであるポリペプチドの一つであ

るFGKと同一配列の受容体が記載されている。腎臓に発現していること、ATP、ADP、UTP、及びUDPによって活性化されることが記載され、スクリーニングのツールとして有用であるとされているが、何の目的のスクリーニングのツールとして有用であるか、その具体的な用途に関する記載はない。特許文献2～特許文献9にはFGKと相同性のある分子が開示されている。特許文献6には当該分子が腎臓において発現していると示されているが具体的な用途に関する記載はない。特許文献7には当該分子が関わるとして多数の疾患名を列挙している中に腎疾患及び腎不全が含まれているが、それを裏付ける記載は全くない。特許文献8にはFGKと相同性の高い分子を含む多数のGPCRが開示され、多数のGPCRに対しそれらが関与するとして多数の疾患名を挙げておりその中に腎疾患が含まれるが具体的実施例の記載はおろか、それらの用途の実験的裏付けは全くない。特許文献9にはFGKと相同性を有する受容体が開示されアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法が開示されている。これらのアゴニスト及びアンタゴニストは血管拡張、低血圧、慢性腎疾患、甲状腺疾患、喘息を含む免疫性疾患の治療に有用であることが記載されている。しかしながら慢性腎疾患の治療に有用であることの根拠は当該分子が腎臓を含む特定の組織に発現していることのみであり、当該分子とCTGFとの関連については何ら記載されていない。特許文献2～5の何れの文献にもFGKと相同性を有する分子と腎疾患との関係、該分子とCTGFとの関係は記載されていない。

従って、腎不全における創薬標的であるCTGFのプロモーターをFGKが活性化することは本発明者らが見出した新規の知見であり、FGK阻害を指標にCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、及びFGKインバースアゴニストを選択することによる腎不全治療薬をスクリーニングする方法、並びに腎不全治療用医薬組成物及びその製造方法は本発明者らによって初めて提供された発明である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、HEK293細胞にpCTGF-luc又はpCOLIA2-lucレポータープラスミドを導入したときのルシフェラーゼ活性及びその活性のFGK遺伝子導入による変化を示すグラフである。グラフの縦軸はルシフェラーゼ活性の相対値を示している。

図2は、HEK293細胞に pEF-BOS-Gqi 及び pSRE-luc レポータープラスミドを同時に導入したときのルシフェラーゼ活性及びその活性の FGK 遺伝子導入による変化を示すグラフである。グラフの縦軸はルシフェラーゼ活性の相対値を示している。

### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を詳細に説明する。

まず、本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「FGK」は「FGK 蛋白質」を、「インバースアゴニスト」は本発明のスクリーニング用ポリペプチド（例えば FGK）の自発活性（すなわち FGK リガンド又はアゴニスト非存在下において、ある平衡状態で存在する活性化 FGK により検出される活性）を抑制する物質を表す。あるポリペプチドが

「CTGF プロモーターを活性化する」か否かの判定方法は、特に限定されるものではないが、例えば実施例3に記載の条件下で用量依存的な該ポリペプチドによる転写活性化を示すか否かを確認することにより、判定することができる。「Gi」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達増幅因子として機能する G 蛋白質のサブファミリーの1つであって、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する G 蛋白質である。アデニル酸シクラーゼの活性が抑制されると、例えば、細胞内 cAMP 濃度が低下する。「ホスホリパーゼ C 活性促進性 G 蛋白質」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達増幅因子として機能する G 蛋白質のサブファミリーの1つであって、ホスホリパーゼ C の活性を促進する G 蛋白質である。ホスホリパーゼ C の活性化が促進されると、例えば、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。ホスホリパーゼ C 活性促進性 G 蛋白質としては、例えば、Gq を挙げることができる。

### <腎不全治療薬スクリーニングツール>

本発明の腎不全治療薬スクリーニングツールには、ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールと、細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールとが含まれる。本明細書において「スクリーニングツール」とは、スクリーニングのために用いる物（具体的にはスクリーニングのために用いるポリペプチド又はポリペプチドを発現している細胞）をいう。「腎不全治療薬スクリーニングツール」と

は、腎不全治療薬をスクリーニングするために、本発明の腎不全治療薬をスクリーニングする方法において試験化合物を接触させる対象となるポリペプチド又は細胞である。前述の〔1〕に記載のポリペプチド、又は〔2〕に記載の細胞の、腎不全治療薬スクリーニングのための使用も本発明に含まれる。

(1) ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツール

本発明のポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールには、

1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである腎不全治療薬スクリーニングツール；

2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）である腎不全治療薬スクリーニングツール；

(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）である腎不全治療薬スクリーニングツール；  
が含まれる。

ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールのうち、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、公知のヒト由来のオーファンGPCRの一つであり、当該ポリペプチドをヒトFGKと称する。

ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる機能的等価改変体としては、、「配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチド」が好ましい。

相同ポリペプチドのうち好ましいものは、配列番号2で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、更に好ましくはCTGFプロモーターを活性化することができる蛋白質である。なお、本明細書における前記「相同性」

とは、Clustal program (HigginsとSharp、Gene、第73巻、第237-244頁、1998年；Thompsonら、Nucleic Acid Res.、第22巻、第4673-4680頁、1994年) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値 (Identities) を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Aliment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

本発明のポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる各種ポリペプチド、すなわち、ヒトFGK、機能的等価改変体、及び相同蛋白質を、以下、スクリーニングツール用ポリペプチドと称する。

スクリーニングツール用ポリペプチドには、ヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の FGK 又はその変異体が含まれる。更には、それらの天然蛋白質（すなわち、ヒト由来の変異体、又はヒト以外の生物由来の FGK 若しくはその変異体）又はヒト FGK を元にして遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白質などが含まれる。なお、本明細書において「変異体」 (variation) とは、同一種内の同一蛋白質にみられる個体差、あるいは、数種間の相同蛋白質にみられる差異を意味する。

ヒト FGK のヒトにおける変異体、又はヒト以外の生物由来の FGK 若しくはその変異体は、当業者であれば、ヒト FGK 遺伝子の塩基配列（例えば、配列番号 1 で表される塩基配列）の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法 (Maniatis, T. ら、

「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982 等) に従って実施することが可能である。

例えば、ヒト FGK 遺伝子の塩基配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物 [例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）] 由来の試料（例えば、総 RNA 若しくは mRNA 画分、cDNA ライブラリー、又はファージライブ

ラリー) とを用いて PCR 法又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、蛋白質の遺伝子を取得し、その遺伝子を適当な発現系を用いて発現させ、発現した蛋白質が、例えば、実施例 3 に記載の方法により、CTGF プロモーターを活性化することを確認することにより、所望の蛋白質を取得することができる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白質は、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法 (site-specific mutagenesis; Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984) により、蛋白質の遺伝子を取得し、その遺伝子を適当な発現系を用いて発現させ、発現した蛋白質が、例えば、実施例 3 に記載の方法により、CTGF プロモーターを活性化することを確認することにより、所望の蛋白質を取得することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドは、種々の公知の方法によって得ることができ、例えば、目的蛋白質をコードする遺伝子を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。より具体的には、後述する細胞又は形質転換細胞 (すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする DNA を含む発現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞) を、スクリーニングツール用ポリペプチドの発現が可能な条件下で培養し、受容体蛋白質の分離及び精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から目的蛋白質を分離及び精製することにより調製することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを調製する際に、それをコードする遺伝子を取得する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、ヒト FGK を調製する場合には、それをコードする遺伝子として、例えば、配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA を用いることができる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従って決定することができる (Crantham, R. ら, Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。

配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA は、例えば、化学合成法によって製造した DNA 断片を結合することにより取得することもできるし、あるいは、ヒト FGK の産生能力を有する細胞又は組織に由来する cDNA ライブラリーを鋳型とし、配列番号 1 で表される塩基配列に基づいて設計した適当なプライマーセット

を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（Saiki, R. K. ら, Science, 239, 487-491, 1988）により、取得することもできる。前記のヒト FGK の産生能力を有する細胞又は組織としては、例えば、ヒト腎臓などを挙げることができる。また、前記プライマーセットとしては、配列番号 3 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 4 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせを挙げることができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドの調製において使用することのできる分離及び精製方法は、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順で実施することができる。例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドを表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁した後、ホモジナイズし、遠心分離することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを含む細胞膜画分を得ることができる。得られた細胞膜画分を可溶化した後、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー〔例えば、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等〕、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、スクリーニングツール用ポリペプチドを精製することができる。なお、細胞膜画分を可溶化するには、できるだけ緩和な可溶化剤（例えば、CHAPS、Triton X-100、又はジキトニン等）を用いることにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを調製するには、所望に応じて、スクリーニングツール用ポリペプチドと適当なマーカ配列とをインフレームで融合して発現させることで、前記ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、又は精製等を容易に行なうことができる。前記マーカ配列としては、例えば、FLAG エピトープ、ヘキサヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又は myc エピトープなどを挙げることができる。また、マーカ配列とスクリーニングツール用ポリペプチドとの間に、プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ、ファクター Xa、又はトロンビンなど）が認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可

能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とヘキサヒスチジン・タグとをトロンビン認識配列で連結した報告がある (Hayashi, M. K. 及び Haga, T., J. Biochem., 120, 1232-1238, 1996)。

## (2) 細胞型腎不全治療薬スクリーニングツール

本発明の細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールには、

- 1) ヒト FGK を発現している細胞である、腎不全治療薬スクリーニングツール；
- 2) 機能的等価改変体を発現している細胞である、腎不全治療薬スクリーニングツール；及び
- 3) 相同蛋白質を発現している細胞である、腎不全治療薬スクリーニングツールが含まれる。

本発明の細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる細胞（以下、スクリーニングツール用細胞と称する）は、細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いる際に前記スクリーニングツール用ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではなく、人為的に前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞であることもできるし、または、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株であることもできるが、人為的に前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞が好ましい。

本発明の細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる各種形質転換細胞（以下、スクリーニングツール用形質転換細胞と称する）を作成するために使用することのできる宿主細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することができる限り、特に限定されるものではなく、例えば、通常使用される公知の微生物、例えば、大腸菌又は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、あるいは、公知の培養細胞、例えば、脊椎動物細胞（例えば、CHO 細胞、HEK293 細胞、又は COS 細胞）又は昆虫細胞（例えば、Sf9 細胞）を挙げることができる。

前記脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞である COS 細胞

(Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. 及び Chasin, L. A.,



Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞、あるいは、前記 HEK293 細胞にエプスタイン・バーウイルスの EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞（インビトロジェン社）を挙げることができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞を作成するために使用することのできる発現ベクターは、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することができる限り、特に限定されるものではなく、使用する宿主細胞の種類に応じて、適宜選択することができる。

例えば、脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S.

ら, Mol. Cell. Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はサイトメガロウイルスプロモーターを有する pCEP4 (インビトロジェン社) 等を挙げることができる。

より詳細には、宿主細胞として COS 細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、更に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及び RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及び Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又は pCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. 及び Magnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham, F. L. 及び van der Ed, A. J., Virology, 52, 456-457, 1973)、カチオン性リポソーム試薬 (Lipofectamine; Gibco BRL 社) を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neumann, E. ら, EMBO J., 1, 841-845, 1982) 等により、COS 細胞に取り込ませることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする DNA を含む発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, 「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又は pSV2-neo (Southern, P. J. 及び Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

更に、宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、エプスタイン・バーウイルスの複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4 (インビトロジェン社) などを用いることができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、常法に従って培養することができ、前記培養により細胞内又は細胞表面にスクリーニングツール用ポリペプチドが生産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS 細胞の場合には、例えば、RPMI-1640 培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地

(DMEM) 等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清 (FBS) 等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA 細胞の場合には、牛胎仔血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えた培地を使用することができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではない。スクリーニングツール用形質転換細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドに加え、C 末端のアミノ酸配列が、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列 (Asp-Cys-Gly-Leu-Phe) である G 蛋白質を発現していることが好ましい。配列番号 16 で表されるアミノ酸配列は、Gi の C 末端の 5 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列であり、以下、「C 末端のアミノ酸配列が配列番号 16 で表されるアミノ酸配列である G 蛋白質」を「C 末端 Gi 型 G 蛋白質」と称する。

前記 C 末端 Gi 型 G 蛋白質としては、例えば、(1) Gi、又は (2) C 末端の A

ミノ酸配列が、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼ C 活性促進性 G 蛋白質（例えば、Gq）のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラである G 蛋白質キメラを挙げることができる。以下、Gq のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラである G 蛋白質キメラを、Gqi と称する。

スクリーニングツール用ポリペプチドは、Gi の C 末端の 5 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列（すなわち、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列）を認識して、Gi と結合する。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドは、Gi のみならず、Gqi と結合することができる。スクリーニングツール用形質転換細胞において、スクリーニングツール用ポリペプチドと C 末端 Gi 型 G 蛋白質とが発現されると、これらのポリペプチドは細胞内で結合することができる。

前記 Gqi における「Gq のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチド」は、C 末端アミノ酸配列を含まず、しかも、ホスホリパーゼ C の活性を促進する活性を有する限り、特に限定されるものではないが、例えば、C 末端の 5 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を欠失した Gq の N 末端側部分ポリペプチドを挙げることができる。

前記 Gqi における「Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチド」は、Gi の C 末端の 5 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、しかも、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有しない限り、特に限定されるものではないが、例えば、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列からなる Gi の C 末端側部分ポリペプチドを挙げることができる。

#### <インバースアゴニスト検出方法>

前記スクリーニングツール用ポリペプチド、又はスクリーニングツール用細胞を検出ツールに用いて、試験化合物が本発明のスクリーニング用ポリペプチド（好ましくは FGK）のインバースアゴニストであるか否かを検出することができる。腎不全治療薬の標的となる CTGF のプロモーターを活性化するスクリーニング用ポリペプチド（例えば FGK）は、それ自身単独でも腎不全治療薬スクリーニ

ングツールとして用いることができ、スクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）のインバースアゴニストは腎不全治療薬として有用な物質である。本発明の検出方法において、スクリーニング用ポリペプチド（例えばFGK）の活性の変化は、スクリーニングに用いる該蛋白質の生理学的な特性に応じた活性の指標を測定することにより行われる。指標とは、たとえば  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動や cAMP 量の変動である。具体的には、以下に述べるような検出方法を示すことができる。スクリーニング用ポリペプチドとしては、該受容体を発現させた細胞、該細胞の膜分画、又は該蛋白質精製標品などを用いることもできる。

本発明による、試験化合物がスクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）のインバースアゴニストであるか否かを検出する方法には、

- 1) 細胞内における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動を指標として、スクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）に対するインバースアゴニストであるか否かを検出する方法（すなわち、 $\text{Ca}^{2+}$  型検出方法）；
- 2) 細胞内における cAMP 量の変動を指標として、スクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）に対するインバースアゴニストであるか否かを検出する方法（すなわち、cAMP 型検出方法）；及び
- 3) GTP  $\gamma$  S 結合法を利用するスクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）に対するインバースアゴニストであるか否かを検出する方法（以下、GTP  $\gamma$  S 結合型検出方法と称する）

が含まれる。これらの検出方法について、順次説明する。

#### 1) $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法

本発明の  $\text{Ca}^{2+}$  型検出方法は、細胞として、(i) スクリーニングツール用ポリペプチドと、(ii) C末端のアミノ酸配列が、配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドと  $\text{Gi}$  の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるG蛋白質キメラ（例えば、 $\text{Gqi}$ ）とを共発現している細胞（以下、 $\text{Ca}^{2+}$  型検出用細胞と称する）を使用する。本発明の  $\text{Ca}^{2+}$  型検出方法においてインバースアゴニストであるか否かを検出する場合には、 $\text{Ca}^{2+}$  型検出用細胞と試験化合物とを接触させ、前記  $\text{Ca}^{2+}$  型検出用細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を、

直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化は、例えば、カルシウム結合性蛍光試薬（例えば、f u r a 2 又は f l u o 3 等）を用いて、直接的に  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子の上流にアクチベータープロテイン 1 (AP1) 応答配列を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的に  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を分析することもできる。

$\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞と試験化合物とを接触させた場合に、 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少すれば、前記試験化合物は、スクリーニング用ポリペプチド（好ましくは FGK）に対するインバーサゴニストであると判定することができる。なお、コントロールとして、スクリーニングツール用ポリペプチドと Gqi とを共発現している  $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されておらず、しかも、Gqi が発現しているコントロール用細胞、あるいは、形質転換前の宿主細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記コントロール用細胞又は前記宿主細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少しないことを確認することが好ましい。

より具体的には実施例 4 又は実施例 5 の方法を利用することにより実施できる。

これまで説明したように、本発明の  $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法においては、共役蛋白質として Gi をそのまま使用するのではなく、Gqi を使用するので、cAMP 濃度ではなく、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を分析することによりインバーサゴニストであるか否かの検出を実施することができる。通常、cAMP 濃度に比べ、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の方が、より簡易且つ迅速に測定することができる。

## 2) cAMP 型検出方法

本発明の cAMP 型検出方法では、スクリーニングツール用細胞を cAMP 型検出用細胞として使用する。通常の宿主細胞では Gi が構成的に発現しているので、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株を用いるか、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする DNA を含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、cAMP 型検出用細胞を得ることができる。

本発明の cAMP 型検出方法においてインバーサゴニストであるか否かを検出

する場合には、cAMP 型検出用細胞と試験化合物とを接触させ、前記 cAMP 型検出用細胞内の cAMP 濃度の変化を、直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。cAMP 濃度の変化は、例えば、市販の cAMP 測定キット（アマシャム社等）を用いて、直接的に cAMP 濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子上流に cAMP 応答配列（CRE）を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的に cAMP 濃度の変化を分析することもできる。

cAMP 型検出用細胞と試験化合物とを接触させた場合に、cAMP 型検出用細胞内の cAMP 濃度が上昇すれば、前記試験化合物は、FGK に対するインバースアゴニストであると判定することができる。また、コントロールとして、スクリーニングツール用ポリペプチドと  $G_i$  とを発現している cAMP 型検出用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されていない細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記細胞内の cAMP 濃度が上昇しないことを確認することが好ましい。より具体的には、例えば、実施例 4 と同様の条件において、低用量の（例えば  $0.2 \mu\text{g}$  の）FGK を発現させた場合において試験化合物を接触させた場合に試験化合物を接触させない場合と比較して cAMP 濃度が上昇するか否かを検出することにより実施できる。

### 3) GTP $\gamma$ S 結合型検出方法

本発明の GTP  $\gamma$ S 結合型検出方法は、スクリーニングツール用ポリペプチド、前記ポリペプチドを含む細胞膜画分、あるいは、前記ポリペプチドを発現している細胞を用いて、GTP  $\gamma$ S 結合法（Lazareno, S. 及び Birdsall, N. J. M., Br. J. Pharmacol., 109, 1120-1127, 1993）を利用して、FGK に対するインバースアゴニストであるか否かを検出することができる。スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株を用いるか、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードする DNA を含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、GTP  $\gamma$ S 結合型検出方法用の細胞又は細胞膜画分（GTP  $\gamma$ S 型検出用細胞）を得ることができる。

例えば、以下の手順により実施することができる。

すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを含む細胞膜を、 $20\text{mmol/L}$ -

HEPES (pH 7.4)、100mmol/L-NaCl、10mmol/L-MgCl<sub>2</sub>、及び 50mmol/L-GDP 混合溶液中で、<sup>35</sup>S で標識された GTP  $\gamma$  S (400pmol/L) と混合する。試験化合物存在下と試験化合物不在下とでインキュベートした後、反応液をガラスフィルター等で濾過し、フィルターに残存する GTP  $\gamma$  S の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。試験化合物存在下における特異的な GTP  $\gamma$  S 結合の低下を指標に、FGK に対するインバーサゴニストであるか否かを検出することができる。また、コントロールとして、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現している細胞膜の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現していない細胞膜を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物存在下において GTP  $\gamma$  S 結合が低下しないことを確認することが好ましい。

#### <CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法>

本発明にはスクリーニング用ポリペプチド（好ましくは FGK）の活性阻害を指標にして CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法が包含される。該方法には、CTGF 遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイ系が使用できる。既に上述したように、CTGF が腎線維化において TGF- $\beta$  の下流に位置するサイトカインであることが明らかになり、CTGF が腎不全治療薬の創薬標的であることが示されている。本発明者らは後述の実施例 3 に示すように FGK が腎不全における創薬標的と考えられる CTGF のプロモーターを活性化することを見出し、更に、FGK の活性阻害を指標に CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法を確立した。

本発明の CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法は、下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号 13 の DNA (CTGF プロモーター) を発現しているスクリーニングツール用細胞と試験化合物とを接触させる工程及び

前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴として CTGF の発現を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

該方法で用いる細胞として、(i) スクリーニングツール用ポリペプチドと、(ii) CTGF プロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子とを共発現している細胞（以下、CTGF プロモーター型検出用細胞と称する）を使用することができる。

なお、前記細胞は、形質転換する前の宿主細胞が、腎臓由来の細胞であることが好ましい。このような細胞としては、例えば、前出のHEK293細胞を挙げることができる。

レポーター遺伝子アッセイ（田村ら、転写因子研究法、羊土社、1993年）は、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして遺伝子の発現調節を検出する方法である。一般に遺伝子の発現調節はその5'上流域に存在するプロモーター領域と呼ばれる部分で制御されており、転写段階での遺伝子発現量はこのプロモーターの活性を測定することで推測することができる。試験物質がプロモーターを活性化すれば、プロモーター領域の下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このようにプロモーター活性化作用すなわち発現亢進作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。したがって、CTGFプロモーター領域を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、CTGFの発現調節に対する試験化合物の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。配列番号16で表される塩基配列からなるCTGFプロモーター領域と融合された「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子（Luc）、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子（GFP）等があげられる。レポーター遺伝子は、配列番号16で表される塩基配列からなるCTGFのプロモーター領域と機能的に融合されていればよい。CTGFプロモーター型検出用細胞に試験化合物を接触した場合と接触しなかった場合のレポーター遺伝子の発現量を比較することにより試験化合物依存的な転写誘導活性の変化を分析することができる。

コントロールとしてCTGFプロモーター型検出用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されておらず、しかもCTGFプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子が発現しているスクリーニングツール用細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記スクリーニングツール用細胞におけるレポーター活性が抑制されないことを確認することが好ましい。

上記工程を実施し、レポーター活性を抑制する物質を選択することにより、



CTGFの発現を抑制する物質のスクリーニングを実施できる。具体的には、実施例3に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。たとえば実施例3に記載のアッセイ条件に試験化合物を追加することにより、実施例3の条件下でIC50が10  $\mu$ M以下の物質を、好ましくはIC50が1  $\mu$ M以下の物質を、更に好ましくはIC50が0.1  $\mu$ M以下の物質を、CTGF発現を抑制する活性を有する物質として選択することができる。より好ましくは実施例7の条件下で同様に実施することができる。

#### ＜腎不全治療薬をスクリーニングする方法＞

本発明の腎不全治療薬スクリーニングツール（ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツール及び細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールの両方を含む）を用いると、腎不全治療薬をスクリーニングすることができる。

既に説明したように、CTGFが腎線維化においてTGF- $\beta$ の下流に位置するサイトカインであることが明らかになり、CTGFが腎不全治療薬の創薬標的であることすなわちCTGFの発現を制御する物質は腎不全治療薬となることが示されている。また、FGKは腎臓に局在することが明らかとなっている。更に、本発明者らは実施例3に記載するようにFGKがCTGFプロモーターを活性すること及びヒトI型コラーゲンアルファ2サブユニット(COL1A2)プロモーターを活性化することを見出している。これらの知見によれば、スクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）に対するインバーサアゴニスト又はFGK活性阻害によりCTGFの発現を抑制する物質は腎不全治療薬として有用である。従って、これまで説明したスクリーニングツール用ポリペプチドそれ自体、あるいは、スクリーニングツール用細胞それ自体を、腎不全治療薬のスクリーニングにスクリーニングツールとして用いることができる。

本発明の腎不全治療薬スクリーニングツールを用いてスクリーニングにかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felici,

F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明の腎不全治療薬スクリーニングツールにより選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

本発明のスクリーニング方法は検出方法により以下の3つに大別されるが、いずれかの方法を用いて、あるいはこれらを組み合わせることによって、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。以下、本発明のスクリーニング方法、

- (1) スクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）の活性変化を指標とするスクリーニング方法
- (2) スクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）の活性阻害を指標として CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法
- (3) COL1A2 プロモーターを利用しスクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）の活性変化を指標とするスクリーニング方法

について、順次説明する。

- (1) スクリーニング用ポリペプチド（好ましくはFGK）の活性変化を指標とするスクリーニング方法には、

- 1) 細胞内における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動を指標として、インバースアゴニストをスクリーニングする方法（以下、 $\text{Ca}^{2+}$ 型スクリーニング方法と称する）；
- 2) 細胞内における cAMP 量の変動を指標として、インバースアゴニストをスクリーニングする方法（以下、cAMP 型スクリーニング方法と称する）；及び
- 3) GTP  $\gamma$  S 結合法を利用するインバースアゴニストをスクリーニングする方法（以下、GTP  $\gamma$  S 結合型スクリーニング方法と称する）

が含まれ、以下順次説明する。

- 1)  $\text{Ca}^{2+}$ 型スクリーニング方法

本発明の  $\text{Ca}^{2+}$ 型スクリーニング方法は、本発明の  $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法により、イン

バースアゴニストであるか否かを検出する工程、及びインバースアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

インバースアゴニストは、前記  $\text{Ca}^{2+}$  型検出方法において、試験化合物による  $\text{Ca}^{2+}$  型検出用細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少を指標に、スクリーニングすることができる。

例えば試験化合物を一定時間作用させ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少を指標に、その  $\text{IC}_{50}$  が  $10\ \mu\text{M}$  以下の物質を、好ましくは  $\text{IC}_{50}$  が  $1\ \mu\text{M}$  以下の物質を、更に好ましくは  $\text{IC}_{50}$  が  $0.1\ \mu\text{M}$  以下の物質を、インバースアゴニストとして選択することができる。本発明の  $\text{Ca}^{2+}$  型スクリーニング方法でインバースアゴニストをスクリーニングすることにより、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

## 2) cAMP 型スクリーニング方法

本発明の cAMP 型スクリーニング方法は、本発明の cAMP 型検出方法により、インバースアゴニストであるか否かを検出する工程、及びインバースアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

インバースアゴニストは、前記 cAMP 型検出方法において、試験化合物による cAMP 型検出用細胞内の cAMP 濃度上昇を指標に、スクリーニングすることができる。

細胞内 cAMP 濃度の上昇を指標に、その  $\text{ED}_{50}$  が  $10\ \mu\text{M}$  以下（更に好ましくは  $1\ \mu\text{M}$  以下）の試験化合物を、インバースアゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

本発明の cAMP 型スクリーニング方法でインバースアゴニストをスクリーニングすることにより、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

## 3) GTP $\gamma$ S 結合型スクリーニング方法

本発明の GTP  $\gamma$  S 結合型スクリーニング方法は、本発明の GTP  $\gamma$  S 結合型検出方法により、インバースアゴニストであるか否かを検出する工程、及びインバースアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

インバースアゴニストは、前記 GTP  $\gamma$  S 結合型検出方法における、試験化合物

による特異的な GTP  $\gamma$  S 結合の低下を指標にスクリーニングすることができる。

本発明の GTP  $\gamma$  S 結合型スクリーニング方法でインバースアゴニストをスクリーニングすることにより、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

(2) スクリーニング用ポリペプチド（好ましくは FGK）活性阻害を指標として CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法

CTGF の発現を制御する物質は腎不全治療薬となることが示されている。従って、本発明の CTGF 発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、すなわち、下流にレポーター遺伝子を保持する CTGF プロモーターを発現しているスクリーニングツール用細胞と試験化合物とを接触させる工程及び

前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする方法により腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。より具体的には、実施例3又は実施例7に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。たとえば実施例3又は実施例7に記載のアッセイ条件に試験化合物を追加することにより、実施例3又は実施例7の条件下で IC<sub>50</sub> が 10  $\mu$ M 以下の物質を、好ましくは IC<sub>50</sub> が 1  $\mu$ M 以下の物質を、更に好ましくは IC<sub>50</sub> が 0.1  $\mu$ M 以下の物質を、腎不全治療薬として有用な物質として選択することができる。

(3) COL1A2 プロモーターを利用しスクリーニング用ポリペプチド（好ましくは FGK）の活性変化を指標とするスクリーニング方法

腎不全治療薬の標的となる CTGF のプロモーターを活性化するスクリーニング用ポリペプチド（好ましくは FGK）は、それ自身単独でも腎不全治療薬スクリーニングツールとして有用である。本発明者らは後述の実施例3に示すように、FGK が、COL1A2 のプロモーターを活性化することを見出し、COL1A2 プロモーターを利用し FGK 活性変化を指標とするスクリーニング方法を確認した。FGK の活性阻害をインビトロで検出する系の一つとして以下の COL1A2 プロモーターを利用したレポーターアッセイ系が利用できる。

本発明の COL1A2 プロモーターを利用しスクリーニング用ポリペプチド（好ましくは FGK）の活性変化を指標とするスクリーニング方法は、下流にレポーター遺伝子を保持する COL1A2 プロモーターを発現しているスクリーニングツール用

### 細胞と試験化合物とを接触させる工程及び

前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴する。当該スクリーニング方法は、前述のCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法においてCTGFプロモーターのかわりにCOL1A2プロモーターを用いることにより実施できる。上記工程を実施し、レポーター活性を抑制する物質を選択することにより、腎不全治療に有用な物質をスクリーニングすることができる。より具体的には、実施例3に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。たとえば実施例3に記載のアッセイ条件に試験化合物を追加することにより、実施例3の条件下でIC50が10  $\mu$ M以下の物質を、好ましくはIC50が1  $\mu$ M以下の物質を、更に好ましくはIC50が0.1  $\mu$ M以下の物質を、腎不全治療薬として有用な物質として選択することができる。

### <腎不全治療用医薬組成物及びその製造方法>

本発明には、例えば、本発明のスクリーニング方法で選択することのできる、スクリーニングツール用ポリペプチドのインパースアゴニスト〔例えば、DNA、蛋白質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物〕を有効成分とする医薬組成物が包含される。

また、腎不全治療用医薬組成物の品質規格の確認試験において、(1) (i) C末端のアミノ酸配列が、配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるG蛋白質キメラを共発現しているスクリーニングツール用細胞又はその細胞膜と、試験化合物とを接触させる工程、及び(ii) 前記細胞内におけるスクリーニングツール用ポリペプチドの活性の変化を分析する工程、あるいは(2) (i) 下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号13又は14のDNAを発現しているスクリーニングツール用細胞又はその細胞膜と試験化合物とを接触させる工程、及び(ii) 前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程からなる分析を行ない、次いで、分析した物質を製剤化することからなる、腎不全治療用医薬組成物の製造方法も本発明に含まれる。

本発明には、本発明のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、腎不全治療用医薬組成物の製造方法が包含される。

本発明の医薬組成物における有効成分としては、スクリーニングツール用ポリペプチドのインバースアゴニストを用いることができ、前記インバースアゴニストは、例えば、本発明のスクリーニング方法により選択することができる。スクリーニングツール用ポリペプチドのインバースアゴニストとしては、例えば、本発明のスクリーニング方法で選択された化合物（後述の実施例 5～7、表 1 参照）を挙げることができる。本発明の医薬組成物は、本発明のスクリーニング方法で得られた物質を有効成分とする医薬組成物に限定されず、スクリーニングツール用ポリペプチドのインバースアゴニストを有効成分とする腎不全治療用医薬組成物であれば全て包含される。

なお、腎不全治療効果があることの確認は、当業者に公知の方法、あるいは、それを改良した方法を用いることにより実施することができる。腎不全治療効果は尿細管間質線維化の抑制、尿蛋白の抑制、血中クレアチニン量などを指標として検出することができる。例えば、尿細管間質線維化の抑制効果の確認は、非特許文献15又は非特許文献Kidney international、2002年、第61巻、p. 1684-1695記載のUUOモデルマウスもしくはその変法により確認できる。より具体的には以下方法により確認できる。雄性ICRマウスにペントバルビタール（50mg/kg）を0.1mL/10gの液量にて腹腔内投与（i. p.）して麻酔する。左腹部を切開し、左尿管を4-0絹糸にて二箇所で結紮し、その間を切断し、その後切開部を縫合することによりUUOマウスを作製することができる。UUOマウスをコントロール群と試験化合物投与群とに分け、薬物をそのタイプに応じた方法で投与する。投与後（例えば1日1回の投与でUUOマウス作製の5日後）、ペントバルビタール麻酔下にて採血後、左腎（病態腎）と右腎（対照腎）を摘出し、湿重量を測定する。腎を分割して、一部を病理評価（例えばマッソン・トリクロム染色（間質に蓄積したコラーゲン蛋白が青く染色される））することができる。また、一部からRNAを抽出し、線維化のマーカー遺伝子（例えば、CTGF、コラーゲン又はファイブロネクチンなど）の発現を公知の方法（例えばノザンブロットティング又はRT-PCR）にて検出す

ることができる。前記染色において、コントロール群に比較して試験化合物投与群の染色が減少していれば（コラーゲン蛋白量が低下していれば）試験化合物に腎不全治療効果があると判定することができる。また、コントロール群に比較して試験化合物投与群における線維化マーカーの発現量が減少していれば試験化合物に腎不全治療効果があると判定できる。

また、尿蛋白の抑制は、例えば、非特許文献 Pharmacological Research、2003 年、第 47 巻、p. 243-252 記載の 5/6 腎摘ラットもしくはその変法により確認できる。

上記腎不全治療効果の確認方法のうち最も好ましいのは 5/6 腎摘ラットを用いる方法である。より具体的には以下の方法により確認できる。9 週齢の Wistar rat をペントバルビタール（50mg/kg）にて腹腔内投与（i. p.）して麻酔する。左腹部を切開し、左腎の 2/3 を摘出し、1 週後右腎の全摘を行い、5/6 腎摘出腎不全モデルラットを作製することが出来る。5/6 腎摘出腎不全モデルラットをコントロール群と試験化合物投与群とに分け、薬物をそのタイプに応じた方法で投与する（例えば 5/6 腎摘出腎不全モデル作製の 2 週間後から 1 日 1 回の投与）。手術後 1 週ごとに、血圧の測定および個別代謝ケージを用い採尿実験を経時的に（例えば 1 週ごとに 10 週間）行う。屠殺時に腹部大静脈から採血し、腎摘出を行う。尿サンプルはその量や蛋白濃度などを、血液サンプルはコレステロールや尿素窒素、又はクレアチニンなどの濃度を測定し、腎組織サンプルは病理組織変化などを検討する。コントロール群に比較して、例えば、尿中の蛋白量が低下していれば、もしくは血液中の尿素窒素量やクレアチニン量が低下していれば試験化合物に腎不全治療効果があると判定することができる。

本発明のスクリーニング方法により得られる物質又はスクリーニングツール用ポリペプチドのインバースアゴニスト〔例えば、DNA、蛋白質（抗体又は抗体断片を含む）、ペプチド、又はそれ以外の化合物〕を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる薬理学上許容される担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて、医薬組成物として調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注、筋注、若しくは関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。



投与量は、有効成分すなわち本発明のスクリーニング方法により得られる物質の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人(体重60kgとして)において、1日につき約0.1~100mg、好ましくは0.1~50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01~50mg、好ましくは0.01~10mgである。

### 実施例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. 「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982等) に従って実施可能である。

また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

#### (実施例1) FGK をコードする遺伝子の単離

本発明の FGK をコードする全長 cDNA は、ヒト腎臓 cDNA (クロンテック社) をテンプレートとして PCR により取得した。配列番号 3 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、配列番号 4 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた(それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある)。PCR は DNA ポリメラーゼ (Pyrobest DNA Polymerase; 宝酒造社) を用い、5% DMSO 存在下で 98°C (30 秒) / 55°C (30 秒) / 72°C (2 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS-dhfr プラスミド (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322) を用いてクローニングした。構築したプラスミドを pEF-BOS-dhfr-FGK と名付けた。得られたクローンの塩基配列をジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (アプライドバイオシステムズ社) を用いて解析したところ、配列番号 1 で表される塩基配列が得られた。

同配列は 993 塩基のオープンリーディングフレーム (ORF) を持っている。ORF から予測されるアミノ酸配列 (330 アミノ酸) を配列番号 2 に示す。

(実施例 2) ヒト結合組織成長因子 (CTGF) プロモーターを用いたレポータープラスミド及びヒト I 型コラーゲンアルファ 2 サブユニット (COL1A2) プロモーターを用いたレポータープラスミドの取得

ヒト CTGF 及びヒト COL1A2 遺伝子のプロモーター領域の増幅には、ヒト全血由来のゲノム DNA (Human Genomic DNA ; クロンテック社) を鋳型 DNA に用いた。CTGF プロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号 5 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号 6 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。また COL1A2 プロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号 7 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号 8 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。PCR は DNA ポリメラーゼ (Pfu turbo DNA Polymerase ; ストラタジーン社) を用い、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 58° C (30 秒) / 72° C (2 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、CTGF プロモーターの場合は約 1.2kbp、COL1A2 プロモーターの場合は約 0.4kbp の DNA 断片が増幅された。その後各増幅産物を 1 % アガロースゲルにて分離し、スピンカラム (QIAquick Gel Extraction Kit; キアゲン社) にて精製後、これらを鋳型として再度 PCR を行った。CTGF プロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号 9 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号 10 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。また COL1A2 プロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号 11 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号 12 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。なおそれぞれのフォワードプライマーの 5' 末端には KpnI 認識配列、またリバースプライマーの 5' 末端には BglII 認識配列が付加してある。PCR は DNA ポリメラーゼ (Pfu turbo DNA Polymerase ; ストラタジーン社) を用い、

94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 58° C (30 秒) / 72° C (2 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その後各増幅産物を 1 % アガロースゲルにて分離し、スピンカラム (QIAquick Gel Extraction Kit; キアゲン社) にて精製後、KpnI 及び BglII にて消化し、レポーター発現用プラスミド (ピッカジーンベシックベクター2; 東洋インキ社) に挿入してクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI3700 DNA Sequencer (アプライドバイオシステムズ社) で解析し、既知 CTGF プロモーター配列 (GenBank accession No. AL354866) 又は COL1A2 プロモーター配列 (GenBank accession No. AF004877) と合致したクローンをそれぞれ選択した。以上により得られたレポータープラスミドはそれぞれヒト CTGF プロモーターの -1129bp から +24bp (配列番号 13)、又はヒト COL1A2 プロモーターの -337bp から +22bp (配列番号 14) をルシフェラーゼ遺伝子上流に含んでおり、それぞれ pCTGF-luc, pCOL1A2-luc と命名した。

### (実施例 3) CTGF プロモーター及び COL1A2 プロモーターレポーターアッセイ系の構築と FGK 導入による効果

24 ウェルプレート (24-well plate; アサヒテクノグラス社) に HEK293 細胞 (ATCC より入手) を 10% 牛胎児血清入りダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) にて 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  細胞で播種して 37°C で 24 時間培養後、1 ウェルあたり 0.1  $\mu$ g のレポータープラスミド及び最高で 0.5  $\mu$ g のヒト FGK 発現プラスミドの計 0.6  $\mu$ g をトランスフェクション試薬 (FuGENE6; ベーリンガーロシェ社) を用いて添付の指示書に従い遺伝子導入を行った。なお全てのウェル当たりの導入遺伝子量は 1 ウェルあたり計 0.6  $\mu$ g となる様にプラスミドベクター (pcDNA3.1; インビトロジェン社) を加えて調整した。FGK を含まず pcDNA3.1 ベクターのみをレポータープラスミドと共に形質転換した細胞をコントロールとした。遺伝子導入 24 時間後に培地を廃棄し、細胞溶解液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 加えて溶解した。溶解液 50  $\mu$ l にルシフェリン基質液 100  $\mu$ l を加えて反応させた後、ルミノメーター (ML3000; ダイナテックラボラトリーズ社) にて測定した。コントロールのルシフェラーゼ活性に対する相対活性 (コントロールを 1 とする) を図

1 に示す。FGK の発現により CTGF プロモーター及び COL1A2 プロモーターの活性化が観察された。またその活性化における FGK の用量依存性も観察された。以上の事から、FGK は CTGF 及び I 型コラーゲンの発現を誘導することが明らかになった。

本アッセイ系を利用することにより、CTGF 発現を抑制する物質及び腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

#### (実施例 4)FGK 活性変化を指標とするスクリーニング系の構築

本実施例で使用した Gq と Gi とのキメラ蛋白質を発現するための発現プラスミドは、Conklin, B. R. らの方法 (Nature, 363, 274-276, 1993) に従い、Gq の C 末端側の 5 アミノ酸 (Glu-Tyr-Asn-Leu-Val ; 配列番号 15 で表されるアミノ酸配列) を、Gi の C 末端側の 5 アミノ酸 (Asp-Cys-Gly-Leu-Phe ; 配列番号 16 で表されるアミノ酸配列) と置換して構築した遺伝子 (以下、Gqi 遺伝子と称する) を、プラスミド pEF-BOS-dhfr にクローニングして作製した。構築したプラスミドは、プラスミド pEF-BOS-Gqi と命名した。

具体的な方法としては、まず 24 ウェルプレート (24-well plate ; アサヒテクノグラス社) に HEK293 細胞 (ATCC より入手) を 10% 牛胎児血清入りダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) にて 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  細胞で播種して 24 時間培養後、1 ウェルあたり  $0.05 \mu\text{g}$  のルシフェラーゼ遺伝子上流に血清応答配列を挿入したレポータープラスミド pSRE-luc (PathDetect™ SRE *cis*-Reporting System ; ストラタジーン社)、 $0.05 \mu\text{g}$  の pEF-BOS-Gqi 及び最高で  $0.5 \mu\text{g}$  のヒト FGK 発現プラスミド計  $0.6 \mu\text{g}$  をトランスフェクション試薬 (FuGENE6 ; ベーリンガーロシェ社) を用いて遺伝子導入を行った。FGK を含まず pcDNA3.1 ベクターのみをレポータープラスミド及び pEF-BOS-Gqi と共に形質転換した細胞をコントロールとした。他の条件及びレポーター活性の測定は実施例 3 に従った。コントロールのルシフェラーゼ活性に対する相対活性 (コントロールを 1 とする) を図 2 に示す。FGK の発現によりレポーター活性の上昇が観察された。またその活性化における FGK の用量依存性も観察された。以上の事から、本アッセイ系によって FGK 活性を阻害する物質、すなわち腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることが可能となった。

#### (実施例 5) FGK 活性を阻害する物質のスクリーニング

実施例 4 において構築した FGK 活性変化を指標とするスクリーニング系を用いて試験物質のスクリーニングを行った。

96 ウェルプレート (96-well plate ; アサヒテクノグラス社) に HEK293 細胞 (ATCC より入手) を 10%牛胎児血清入りダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) にて 1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$  細胞で播種して 37°C にて 24 時間培養した。1 ウェルあたり 0.01  $\mu\text{g}$  のレポータープラスミド pSRE-luc (実施例 4) 、0.03  $\mu\text{g}$  の pEF-BOS-Gqi 及び 0.02  $\mu\text{g}$  のヒト FGK 発現プラスミド計 0.06  $\mu\text{g}$  をトランスフェクション試薬 (FuGENE6 ; ベーリンガーロシェ社) を用いて遺伝子導入を行った。導入後 37°C にて 6 時間培養した後、試験化合物のジメチルスルホキシド溶液を最終濃度が 30  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.3  $\mu\text{M}$  又は 0.1  $\mu\text{M}$  となるように添加し、更に 37°C にて 24 時間培養した。その後レポーター活性を測定し、試験化合物による 50%活性抑制濃度 (IC50) を決定した。化合物処理に対するコントロールとして、等量のジメチルスルホキシドのみを加えた場合のレポーター活性を 100%とした。他の条件及びレポーター活性の測定は実施例 4 に従った。FGK を発現させた細胞において FGK 活性を阻害する物質 (IC50 が 10  $\mu\text{M}$  以下の物質) を FGK のインバースアゴニストとして選択したところ 7 個の異なる化合物を取得することができた。これらの化合物の構造、活性及び入手先を表 1 に示す。

#### (実施例 6) FGK 活性を阻害する物質による CTGF 発現抑制の検出

12 ウェルプレート (12-well plate ; アサヒテクノグラス社) にヒト近位尿管上皮初代培養細胞 (RPTEC ; アサヒテクノグラス社) を腎上皮細胞用増殖培地 (ブレットキット REGM ; アサヒテクノグラス社) にて 1 ウェルあたり  $2 \times 10^5$  細胞で播種した。37°C にて 24 時間培養後、実施例 5 にて得た試験化合物 (FGK 活性を阻害する物質、すなわち FGK インバースアゴニスト) を最終濃度が 10  $\mu\text{M}$  となる様に培地に添加し、更に 37°C にて 24 時間培養した。その後細胞を回収し、トータル RNA をスピンカラム (RNeasy Mini Kit ; キアゲン社) にて精製した。1.5  $\mu\text{g}$  のトータル RNA 及び逆転写酵素 (PowerScript Reverse Transcriptase ; BD

Biosciences 社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。それらを鋳型として、PRISM7700 Sequence Detector (PERKIN ELMER 社) を用いたリアルタイム PCR 法により、CTGF 及びハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (以下 G3PDH と略す) の発現量を測定した。PCR 反応には SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を使用し、50° C (2 分)、95° C (10 分) の後、95° C (15 秒) / 60° C (60 秒) のサイクルを 40 回繰り返した。CTGF の検出には配列番号 17 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、配列番号 18 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして、また G3PDH の検出には配列番号 19 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、配列番号 20 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして使用した。PCR により得られた CTGF の発現量を G3PDH の発現量で割った値を単位 RNA 量あたりの CTGF 発現量と定義した。また化合物処理に対するコントロールとして、等量のジメチルスルホキシドのみを加えた場合の単位 RNA 量あたりの CTGF 発現量を 100%とした。このアッセイにより得られた CTGF 発現阻害活性 (化合物濃度 10  $\mu$ M における阻害活性) を表 1 に示す。FGK 活性阻害を指標に取得した物質が確かに CTGF 発現を抑制することが確認できた。

#### (実施例 7) FGK による CTGF プロモーター活性化を抑制する化合物のスクリーニング

実施例 3 において構築した、FGK による CTGF プロモーター活性化の系により試験化合物をスクリーニングした。

96 ウェルプレート (96-well plate ; アサヒテクノグラス社) に HEK293 細胞 (ATCC より入手) を 10%牛胎児血清入りダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) にて 1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$  細胞で播種した。37°C にて 24 時間培養後、1 ウェルあたり 0.02  $\mu$ g の pCTGF-luc (実施例 2 参照) 及び 0.02  $\mu$ g のヒト FGK 発現プラスミド計 0.04  $\mu$ g をトランスフェクション試薬 (FuGENE6 ; ベーリンガーロシェ社) を用いて遺伝子導入を行った。導入後 37°C にて 6 時間培養した後、試験化合物のジメチルスルホキシド溶液を最終濃度が 30  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ M 又は 0.1  $\mu$ M となるように添加し、更に 37°C にて 24 時間培養した。その後レポー

ター活性を測定し、試験化合物による 50%活性抑制濃度 (IC50) を決定した。化合物処理に対するコントロールとして、等量のジメチルスルホキシドのみを加えた場合のレポーター活性を 100%とした。他の条件及びレポーター活性の測定は実施例 3 に従った。FGK による CTGF プロモーター活性化を阻害する物質を選択し、IC50 が 10  $\mu$ M 以下の物質を表 1 に示した。本アッセイ系によって CTGF 発現を抑制する物質すなわち腎不全治療薬として有用な物質を確かにスクリーニングすることができることが確認された。

(表 1)

No	Supplier	Reference Code	化合物名	実施例5 pGqi+pSRE-luc reporter 活性抑制 IC50 ( $\mu$ M)	実施例6 内在性 CTGF mRNA 発現抑制 @10 $\mu$ M	実施例7 pCTGF-luc 活性抑制 IC50 ( $\mu$ M)
1	ASINEX	BAS 1247186	N <sup>2</sup> -(4-エトキシフェニル)-4'-メチル-4,5'-ビ-1,3-チアゾール-2,2'-ジアミン	6.1	62%	14.1
2	ASINEX	BAS 2936949	N-(5-クロロ-2-メトキシフェニル)-4-(2-チエニル)-1,3-チアゾール-2-アミン	4.6	72%	16.1
3	ASINEX	BAS 0600431	N-[4'-メチル-2-[(3-メチルフェニル)アミノ]-4,5'-ビ-1,3-チアゾール-2'-イル]アセトアミド 臭化水素酸塩	0.6	79%	2.6
4	MENAI	LJ1100 LIST 95	N-[4-(2-[[3-(トリフルオロメチル)フェニル]アミノ]-1,3-チアゾール-4-イル)フェニル]アセトアミド	3.9	65%	3.6
5	ASINEX	BAS 0600426	N-[2-[(4-ヒドロキシフェニル)アミノ]-4'-メチル-4,5'-ビ-1,3-チアゾール-2'-イル]アセトアミド 臭化水素酸塩	2.5	81%	1.8
6	MAYBRIDGE	SEW 04180	2-[[[4-[4-(エトキシカルボニル)-3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-1-イル]フェニル]アミノ]カルボニル]安息香酸	6.8	35%	3.8
7	MERLIN	MS 2357	N-[4-[2,5-ジメチル-3-(トリフルオロアセチル)-1H-ピロール-1-イル]フェニル]-2-フルオロベンズアミド	3.1	36%	1.7

### 産業上の利用可能性

本発明のスクリーニングツールの一つであるFGKがCTGFのプロモーターを活性化することを見出した。CTGFは腎不全における創薬標的であることが知られており、従って、本発明のスクリーニングツールであるポリペプチドおよび／または前記ポリペプチドを発現している細胞を用いることによって、前記ポリペプチドの阻害を指標にCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、すなわち前記ポリペプチドの阻害剤を選択することによるCTGF発現抑制に基づく腎不全治療薬のスクリーニング方法及び前記ポリペプチドのインバーサゴニストを選択することによる腎不全治療薬をスクリーニングする方法を構築することができる。

また、本発明のスクリーニング方法により得ることができる物質を有効成分とし、担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて製剤化することにより、腎不全治療用医薬組成物を製造することができる。

### 配列表フリーテキスト

配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 3、4、9～12の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。



## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 ～ 10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGF プロモーターを活性化することができるポリペプチドである腎不全治療薬スクリーニングツール。
2. 請求の範囲 1 に記載のポリペプチドを発現している細胞である腎不全治療薬スクリーニングツール。
3. C 末端のアミノ酸配列が、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼ C 活性促進性 G 蛋白質のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラである G 蛋白質キメラを共発現している請求の範囲 2 に記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び  
前記細胞内における請求項 1 記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物がインバースアゴニストであるか否かを検出する方法。
4. C 末端のアミノ酸配列が、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼ C 活性促進性 G 蛋白質のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラである G 蛋白質キメラを共発現している請求の範囲 2 に記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程及び  
前記細胞内における請求の範囲 1 記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、腎不全治療薬をスクリーニングする方法。
5. 下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号 13 の DNA を発現している請求の範囲 2 に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び  
前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする CTGF の発現を抑制する物質をスクリーニングする方法。
6. CTGF の発現を抑制する物質が腎不全治療薬である請求の範囲 5 に記載のスク

リーニングする方法。

7. 下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号 1 4 の DNA を発現している請求の範囲 2 に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする腎不全治療薬をスクリーニングする方法。
8. 請求の範囲 1 に記載のポリペプチドのインバースアゴニストを含有する腎不全治療用医薬組成物。
9. 請求の範囲 4 乃至請求の範囲 7 に記載の方法によって得られる物質を含有する腎不全治療用医薬組成物。
10. 請求の範囲 4 乃至請求の範囲 7 に記載の方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、腎不全治療用医薬組成物の製造方法。
11. 請求の範囲 1 に記載のポリペプチドのインバースアゴニスト及び／又は請求の範囲 4 乃至請求の範囲 7 に記載の方法によって得られる物質を腎不全治療が必要な対象に有効量で投与することを含む、腎不全治療方法。
12. 請求の範囲 1 に記載のポリペプチドのインバースアゴニスト及び／又は請求の範囲 4 乃至請求の範囲 7 に記載の方法によって得られる物質の、腎不全治療用医薬組成物を製造するための使用。

1/1

Fig1.

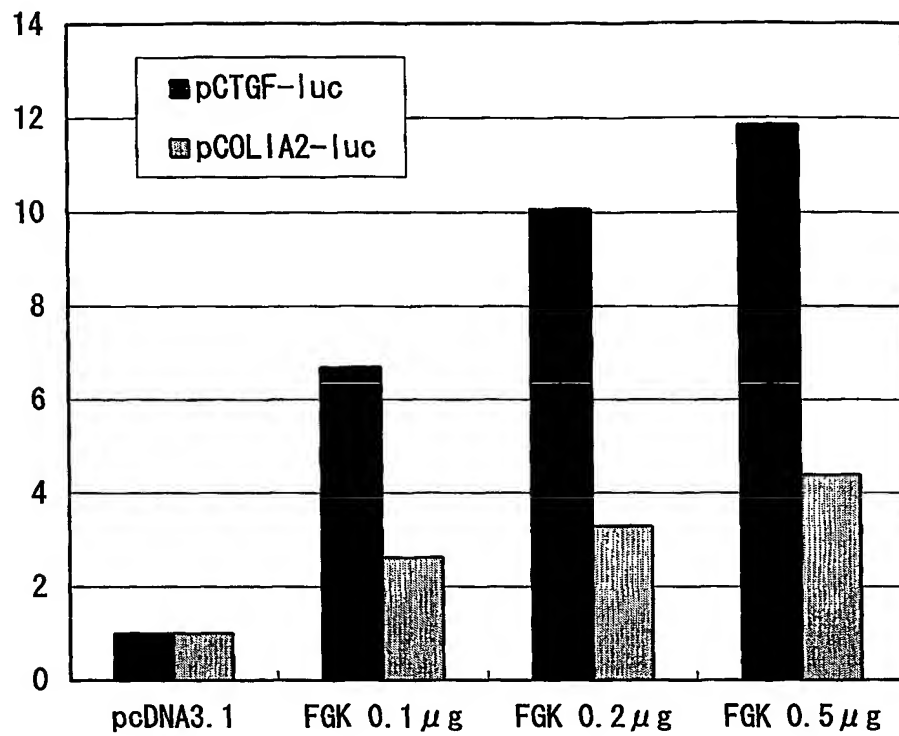
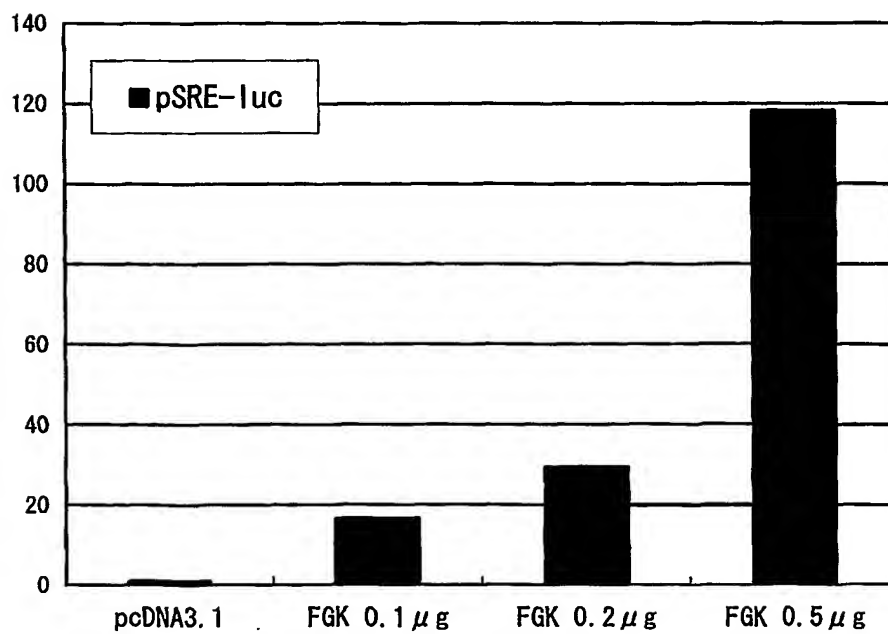


Fig2.



1/13

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd.

&lt;120&gt; Methods for screening an agent to treat renal failure

&lt;130&gt; Y0358-PCT

&lt;150&gt; JP2002-298958

&lt;151&gt; 2002-10-11

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 993

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (990)

&lt;223&gt; inventor:Enjo, Kentaro; Kuromitsu, Sadao

&lt;400&gt; 1

atg gca tgg aat gca act tgc aaa aac tgg ctg gca gca gag gct gcc	48
Met Ala Trp Asn Ala Thr Cys Lys Asn Trp Leu Ala Ala Glu Ala Ala	
1 5 10 15	

ctg gaa aag tac tac ctt tcc att ttt tat ggg att gag ttc gtt gtg	96
Leu Glu Lys Tyr Tyr Leu Ser Ile Phe Tyr Gly Ile Glu Phe Val Val	
20 25 30	

gga gtc ctt gga aat acc att gtt gtt tac ggc tac atc ttc tct ctg	144
---	-----

2/13

Gly Val Leu Gly Asn Thr Ile Val Val Tyr Gly Tyr Ile Phe Ser Leu	
35 40 45	
aag aac tgg aac agc agt aat att tat ctc ttt aac ctc tct gtc tct	192
Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asn Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ser Val Ser	
50 55 60	
gac tta gct ttt ctg tgc acc ctc ccc atg ctg ata agg agt tat gcc	240
Asp Leu Ala Phe Leu Cys Thr Leu Pro Met Leu Ile Arg Ser Tyr Ala	
65 70 75 80	
aat gga aac tgg ata tat gga gac gtg ctc tgc ata agc aac cga tat	288
Asn Gly Asn Trp Ile Tyr Gly Asp Val Leu Cys Ile Ser Asn Arg Tyr	
85 90 95	
gtg ctt cat gcc aac ctc tat acc agc att ctc ttt ctc act ttt atc	336
Val Leu His Ala Asn Leu Tyr Thr Ser Ile Leu Phe Leu Thr Phe Ile	
100 105 110	
agc ata gat cga tac ttg ata att aag tat cct ttc cga gaa cac ctt	384
Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Lys Tyr Pro Phe Arg Glu His Leu	
115 120 125	
ctg caa aag aaa gag ttt gct att tta atc tcc ttg gcc att tgg gtt	432
Leu Gln Lys Lys Glu Phe Ala Ile Leu Ile Ser Leu Ala Ile Trp Val	
130 135 140	
tta gta acc tta gag tta cta ccc ata ctt ccc ctt ata aat cct gtt	480
Leu Val Thr Leu Glu Leu Leu Pro Ile Leu Pro Leu Ile Asn Pro Val	
145 150 155 160	
ata act gac aat ggc acc acc tgt aat gat ttt gca agt tct gga gac	528
Ile Thr Asp Asn Gly Thr Thr Cys Asn Asp Phe Ala Ser Ser Gly Asp	
165 170 175	
ccc aac tac aac ctc att tac agc atg tgt cta aca ctg ttg ggg ttc	576

3/13

Pro Asn Tyr Asn Leu Ile Tyr Ser Met Cys Leu Thr Leu Leu Gly Phe  
 180 185 190

ctt att cct ctt ttt gtg atg tgt ttc ttt tat tac aag att gct ctc 624  
 Leu Ile Pro Leu Phe Val Met Cys Phe Phe Tyr Tyr Lys Ile Ala Leu  
 195 200 205

ttc cta aag cag agg aat agg cag gtt gct act gct ctg ccc ctt gaa 672  
 Phe Leu Lys Gln Arg Asn Arg Gln Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Glu  
 210 215 220

aag cct ctc aac ttg gtc atc atg gca gtg gta atc ttc tct gtg ctt 720  
 Lys Pro Leu Asn Leu Val Ile Met Ala Val Val Ile Phe Ser Val Leu  
 225 230 235 240

ttt aca ccc tat cac gtc atg cgg aat gtg agg atc gct tca cgc ctg 768  
 Phe Thr Pro Tyr His Val Met Arg Asn Val Arg Ile Ala Ser Arg Leu  
 245 250 255

ggg agt tgg aag cag tat cag tgc act cag gtc gtc atc aac tcc ttt 816  
 Gly Ser Trp Lys Gln Tyr Gln Cys Thr Gln Val Val Ile Asn Ser Phe  
 260 265 270

tac att gtg aca cgg got ttg ggc ttt ctg aac agt gtc atc aac cct 864  
 Tyr Ile Val Thr Arg Ala Leu Gly Phe Leu Asn Ser Val Ile Asn Pro  
 275 280 285

gtc ttc tat ttt ctt ttg gga gat cac ttc agg gac atg ctg atg aat 912  
 Val Phe Tyr Phe Leu Leu Gly Asp His Phe Arg Asp Met Leu Met Asn  
 290 295 300

caa ctg aga cac aac ttc aaa tcc ctt aca tcc ttt agc aga tgg gct 960  
 Gln Leu Arg His Asn Phe Lys Ser Leu Thr Ser Phe Ser Arg Trp Ala  
 305 310 315 320

cat gaa ctc cta ctt tca ttc aga gaa aag tga 993

4/13

His Glu Leu Leu Leu Ser Phe Arg Glu Lys  
325 330

<210> 2  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Trp Asn Ala Thr Cys Lys Asn Trp Leu Ala Ala Glu Ala Ala  
1 5 10 15

Leu Glu Lys Tyr Tyr Leu Ser Ile Phe Tyr Gly Ile Glu Phe Val Val  
20 25 30

Gly Val Leu Gly Asn Thr Ile Val Val Tyr Gly Tyr Ile Phe Ser Leu  
35 40 45

Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asn Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ser Val Ser  
50 55 60

Asp Leu Ala Phe Leu Cys Thr Leu Pro Met Leu Ile Arg Ser Tyr Ala  
65 70 75 80

Asn Gly Asn Trp Ile Tyr Gly Asp Val Leu Cys Ile Ser Asn Arg Tyr  
85 90 95

Val Leu His Ala Asn Leu Tyr Thr Ser Ile Leu Phe Leu Thr Phe Ile

5/13

100

105

110

Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Lys Tyr Pro Phe Arg Glu His Leu  
115 120 125

Leu Gln Lys Lys Glu Phe Ala Ile Leu Ile Ser Leu Ala Ile Trp Val  
130 135 140

Leu Val Thr Leu Glu Leu Leu Pro Ile Leu Pro Leu Ile Asn Pro Val  
145 150 155 160

Ile Thr Asp Asn Gly Thr Thr Cys Asn Asp Phe Ala Ser Ser Gly Asp  
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Leu Ile Tyr Ser Met Cys Leu Thr Leu Leu Gly Phe  
180 185 190

Leu Ile Pro Leu Phe Val Met Cys Phe Phe Tyr Tyr Lys Ile Ala Leu  
195 200 205

Phe Leu Lys Gln Arg Asn Arg Gln Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Glu  
210 215 220

Lys Pro Leu Asn Leu Val Ile Met Ala Val Val Ile Phe Ser Val Leu  
225 230 235 240

Phe Thr Pro Tyr His Val Met Arg Asn Val Arg Ile Ala Ser Arg Leu



6/13

245

250

255

Gly Ser Trp Lys Gln Tyr Gln Cys Thr Gln Val Val Ile Asn Ser Phe  
260 265 270

Tyr Ile Val Thr Arg Ala Leu Gly Phe Leu Asn Ser Val Ile Asn Pro  
275 280 285

Val Phe Tyr Phe Leu Leu Gly Asp His Phe Arg Asp Met Leu Met Asn  
290 295 300

Gln Leu Arg His Asn Phe Lys Ser Leu Thr Ser Phe Ser Arg Trp Ala  
305 310 315 320

His Glu Leu Leu Leu Ser Phe Arg Glu Lys  
325 330

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 3

ggtctagaat ggcattggaat gcaacttgc

7/13

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 4

ggtctagatt atcacttttc totgaatgaa ag

32

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

tcaggctgca tgttccttg

19

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

tcctctcagc ggggaagag

19

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

8/13

&lt;400&gt; 7

gacgtgtccc atagtgtttc c

21

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

tcctgctgcc gtggtgct

18

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 9

ggggtacctc aggctgcatg ttcccttg

27

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 10

9/13

ggaagatctt cctctcagcg gggaagag

28

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 11

ggggtagcga cgtgtccat agtgtttcc

29

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized  
primer sequence

&lt;400&gt; 12

ggaagatctt cctgctgcg tgggtgct

27

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1159

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

tcaggctgca tgttccttgg gtaatgagaa gtcacaatca ctattcatag atgtgtgggg

60

10/13

agtcactaaa aatatattat tcactgtcaa tottagttta tatccagata caacagggtg 120  
cactgctctt gtaatggaat cagacttctt attttaacaa gacaaaccaa atccaatcca 180  
catttgaaga ttataggttt taatataaga aaatgcactc atttctcaaa gaccctagtg 240  
aagctgtgtt taaatgctcc taggtgaacc ccotttgcac ccagtggtc ccaccctgac 300  
accagagcc cctacctacc caacacagaa tcatttgctc tgatagaaca atggatccct 360  
ttttctggaa acattgatgg ccactcctcc ctgtccttg cctatataaa actcctacat 420  
atattaagag aaaactaagc aagagttttg gaaatctgcc ccaggagact gcatcctgag 480  
tcacacgct ctttgttctc tttcttgtcc caaaaccgtt acctcaagtg acaaatgatc 540  
aaatctcaaa tatagaattc agggttttac aggtaggcat ctgaggatt tcaaattggtt 600  
aaaagcaact cactcctttt ctactctttg gagagtttca agagcctata gcctctaaaa 660  
cgcaaatcat tgctaagggt tgggggggag aaaccttttc gaatttttta ggaattcctg 720  
ctgtttgcct cttcagctac ctacttccta aaaaggatgt atgtcagtgg acagaacagg 780  
gcaaacttat tcgaaaaaga aataagaaat aattgccagt gtgtttataa atgatatgaa 840  
tcaggagtgg tgogaaggagg atagggaataa aaaaattcta tttggtgctg gaaatactgc 900  
gctttttttt ttctttttt tttttttctg tgagctggag tgtgccagct ttttcagacg 960  
gaggaatgct gagtgtcaag gggtcaggat caatccggtg tgagttgatg aggcaggaag 1020  
gtggggagga atgcgaggaa tgtccctggt tgtgtaggac tccattcagc tcattggoga 1080  
gccgcggccg ccgggagcgt ataaaagcct cgggccgccc gcccacaaact cacacaacaa 1140

11/13

ctcttccccg ctgagagga

1159

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 355

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

gacgtgtccc atagtgtttc caaacttggg aagggcgggg gagggcggga ggatgcggag 60

ggcggaggta tgcagacaac gagtcagagt ttccccttga aagcctcaaa agtgtccacg 120

tcctcaaaaa gaatggaacc aatttaagaa gccagccccg tggccacgtc ccttccccca 180

ttcgtccct cctctgcgc cccgcaggct cctcccagct gtggctgcc gggccccag 240

ccccagccct ccattggtg gagggccctt tggaggcacc ctagggccag ggaaactttt 300

gccgtataaa tagggcagat ccgggcttta ttattttagc accacggcag cagga 355

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

Glu Tyr Asn Leu Val

1

5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 5

12/13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

Asp Cys Gly Leu Phe

1

5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

taccaatgac aacgcctcc

19

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

atgtcttcat gctggtgcag

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

gggaaggtga aggtcgga

18

13/13

<210> 20

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gcagccctgg tgaccag

17



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12967

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10, C12P21/02, G01N33/50,  
G01N33/15, A61K38/16, A61P13/12// (C12N15/12, C12R1:91),  
(C12N5/10, C12R1:91), (C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N1/00-15/90, C07K14/00-16/46, C12P21/00-08,  
G01N33/00-98, A61K31/00-48/00, A61P1/00-43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 97/20045 A2 (COR THERAPEUTICS INC.), 05 June, 1997 (05.06.97), & JP 2000-500658 A & EP 868510 A2 & US 5871963 A & US 6063582 A	1,2/3-10,12
X/Y	WO 00/31258 A2 (ARENA PHARM INC.), 02 June, 2000 (02.06.00), & EP 1133559 A2	1,2/3-10,12
X/Y	WO 01/98351 A2 (INCYTE GENOMICS INC.), 27 December, 2001 (27.12.01), & EP 1297130 A2	1-3,5/4, 6-10,12
X/Y	WO 00/22131 A2 (ARENA PHARM INC.), 20 February, 2000 (20.02.00), & JP 2003-525018 A & EP 1137776 A2 & US 2003/0018182 A1	1-3,5/4, 6-10,12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 November, 2003 (11.11.03)

Date of mailing of the international search report  
02 December, 2003 (02.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12967

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 97/24929 A1 (HUMAN GENOME SCI. INC.), 17 July, 1997 (17.07.97), & JP 2000-505644 A & EP 955808 A1	1-3, 5/4, 6-10, 12
P, X/ P, Y	WO 02/97031 A2 (INCYTE GENOMICS INC.), 05 December, 2002 (05.12.02), (Family: none)	1, 2/ 3-10, 12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12967

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention according to claim 11 pertains to a method of treating renal failure which falls within the category of methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/705, C12N5/10, C12P21/02, G01N33/50, G01N33/15, A61K38/16,  
A61P13/12 // (C12N15/12, C12R1:91), (C12N5/10, C12R1:91), (C12P21/02, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N1/00~15/90, C07K14/00~16/46, C12P21/00~08, G01N33/00~98, A61K31/00~48/00,  
A61P1/00~43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 97/20045 A2 (COR THERAPEUTICS INC.) 1997.06.05 & JP 2000-500658 A & EP 868510 A2 & US 5871963 A & US 6063582 A	1, 2/ 3-10, 12
X/Y	WO 00/31258 A2 (ARENA PHARM INC.) 2000.06.02 & EP 1133559 A2	1, 2/ 3-10, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.11.03

国際調査報告の発送日

02.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 01/98351 A2 (INCYTE GENOMICS INC.) 2001.12.27 & EP 1297130 A2	1-3, 5/4, 6-10, 12
X/Y	WO 00/22131 A2 (ARENA PHARM INC.) 2000.02.20 & JP 2003-525018 A & EP 1137776 A2 & US 2003/0018182 A1	1-3, 5/4, 6-10, 12
X/Y	WO 97/24929 A1 (HUMAN GENOME SCI. INC.) 1997.07.17 & JP 2000-505644 A & EP 955808 A1	1-3, 5/4, 6-10, 12
PX/PY	WO 02/97031 A2 (INCYTE GENOMICS INC.) 2002.12.05 (ファミリーなし)	1, 2/ 3-10, 12

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲11に係る発明は、腎不全治療方法であり、人の身体の治療による処置に該当する。
2. ☐ 請求の範囲                      は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。